

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 05 septembre 2001 (05.09.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02494	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp226/80P
Date du dépôt international (jour/mois/année) 08 septembre 2000 (08.09.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 10 septembre 1999 (10.09.99)
Déposant MOCK, Michèle	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

10 avril 2001 (10.04.01)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:2. L'élection ☒ a été faite☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Formulaire PCT/IB/331 (juillet 1992)

Fonctionnaire autorisé

Farid ABBOU

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

FR0002494

THIS PAGE BLANK (USPTO)

101069461 /
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BLOcp226/80P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02494	International filing date (<i>day/month/year</i>) 08 September 2000 (08.09.00)	Priority date (<i>day/month/year</i>) 10 September 1999 (10.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 39/07		
Applicant INSTITUT PASTEUR		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 10 April 2001 (10.04.01)	Date of completion of this report 26 November 2001 (26.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02494

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages 1-13, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the claims, Nos. 1-11, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the drawings, sheets/fig 1/3-3/3, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/02494

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-8	YES
	Claims	9-11	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-7	YES
	Claims	8-11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1 Reference is made to the following documents:

D1: DATABASE WPI Section Ch, Week 200007 Derwent

Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-084616 XP002141827 & RU C 2 115 433 (MICROBIOLOGY RES INST), 20 July 1998 (1998-07-20)

D2: WO A 92 19720 (PASTEUR INSTITUT) 12 November 1992 (1992-11-12) & FR A 2 676 068, 6 November 1992 (1992-11-06), cited in the application

D3: EP A 0 739 981 (UNIV BRUXELLES) 30 October 1996 (1996-10-30)

D4: WELKOS S L FRIEDLANDER A M: "Comparative safety and efficacy against Bacillus anthracis of protective antigen and live vaccines in mice," MICROBIAL PATHOGENESIS, Vol. 5, No. 2, 1988, pages 127-140, XP000922808

D5: TURNBULL P C B: "ANTHRAX VACCINES: PAST, PRESENT AND FUTURE," VACCINE, Vol. 9, No. 8, 1 August 1991 (1991-08-01), pages 533-539, XP000215550 cited in the application

D6: STEPANOV A V ET AL.: "Development of novel vaccines against anthrax in man," JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Vol. 44, No. 1, 26 January 1996 (1996-01-26), pages

THIS PAGE BLANK (CONT.)

155-160, XP004036861

- D7: ABALAKIN V A ET AL.: "Protective and other biological properties of *Bacillus anthracis* soluble antigen," JOURNAL OF HYGIENE, EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, Vol. 35, No. 1, 1991, pages 83-95, XP000922839
- D8: ABALAKIN V A ET AL.: "Vlianië protektivnogo antigena *Bacillus anthracis* na formirovanië immuniteta pod deistviem sibireiazvennykh jivvykh vaktsin," ZHURNAL MIKROBIOLOGII, EPIDEMIOLOGII I IMMUNOLOGII, No. 5, 1990, pages 72-75, XP002141826

2 Industrial applicability [PCT Article 33(4)]:

The content of Claims 1-11 is industrially applicable.

3 Novelty [PCT Article 33(2)]:

3.1 Claims 1-7

Document D1 (Derwent summary) describes a vaccine including, in particular, live spores and the protective antigen PA of *Bacillus anthracis*.

Claims 1 and 3 of the present application therefore differ from D1 in that killed spores are present in the immunogenic or vaccine composition.

Claims 1-7 are thus novel with respect to the document of closest prior art D1.

3.2 Claims 8-11

The RPLC2 strain (see Figure 3 of the present application) appears novel with respect to the cited prior art

THIS PAGE BLANK (L)

documents.

D2, the closest prior art, does not appear to describe a double mutant having the same technical features (see D2, pages 28-29 and Figure 1).

Claim 8 is thus novel.

D3 and D4 describe the use of antibodies against *Bacillus anthracis*, leading to passive immunity (see D3, Claim 18 and D4, summary).

Claim 9 is thus not novel. It should be noted that using mutant strains such as described in Claim 9 does not exclude the use of the antibodies under D3 and D4.

D7 describes *Bacillus anthracis* antigens 34F2 of 39-44 kD and 49-54 kD, obtained from culture supernatant and showing serological immunogenic activity (see D7, page 88, last paragraph).

D8 describes antigens of 34 and 51 kD derived from the protective antigen PA, as well as an antigen of 18 kD (see D8, page 72, left-hand column, penultimate paragraph and French summary, page 75).

Claims 10 and 11 are thus not novel with respect to these two documents. A translation of the entire document D8 appears to be needed in order to overcome this objection.

4 Inventive step [PCT Article 33(3)]:

4.1 Claims 1-7

The problem that Claims 1 and 3 set out to solve can be considered that of providing an alternative immunogenic composition, and/or an alternative vaccine to the vaccine of D1.

The solution suggested in Claims 1 and 3 of the present

THIS PAGE BLANK (USPTO)

application, the use of killed spores, is considered to be inventive [PCT Article 33(3)] for the following reasons:

First, none of the cited documents suggests combining killed spores with the protective antigen PA. Also, Document D5 notes that the attenuated *Bacillus anthracis* vaccines are less effective (see D5, page 534, left column, 3rd paragraph).

The compositions in Claims 1 and 3, resulting in a surprising way in complete protection (see description of the application, pages 8, 9 and 11-13), can therefore be considered to be inventive. It follows that Claims 2 and 4-7 are also inventive.

4.2 Claim 8

It is noted that the genes PA, LF and EF are known in the prior art (see D2). Though novel, the RPLC2 strain does not appear to lead to an unexpected technical effect, nor does it appear to solve a technical problem that could not be solved through another strain already available in the prior art. Consequently, Claim 8, the subject matter of which is an alternative strain of *Bacillus anthracis*, is not inventive. It is furthermore noted that this strain was presented by the applicant as an alternative equivalent to at least one known strain (description of the present application, page 5, lines 3-10).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02494

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements under PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not mention the relevant prior art shown in Documents D1, D3, D4, D7 and D8, nor does it cite said documents.

THIS PAGE BLANK (00810)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02494

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1 The parenthetical technical features are not limiting, see Claims 1, 3, 4, 5 and 7 (PCT Guidelines, PCT Gazette - Section IV, III-4.11). Consequently, the term "PA" is not limiting in Claims 1 and 3 and this introduces doubt as to the content of the compositions of Claims 1-7 (PCT Article 6). Also, the term "protective antigen," on its own, can refer to various antigens, and is furthermore not limited to one or more antigens of *Bacillus anthracis* (PCT Guidelines, PCT Gazette - Section IV, III-4.2).

2 Identifying an antigen in terms of the molecular weight thereof alone is not considered sufficient (PCT Article 6). All the experimental steps whereby the exoantigens were obtained and identified should have been incorporated in Claim 10 (PCT Guidelines, PCT Gazette - Section IV, III-4.2).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

REC'D 29 NOV 2001

PCT PCT

Destinataire:

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
CH - 1211 Genève 20
Suisse

NOTIFICATION RELATIVE A LA
TRANSMISSION DE DOCUMENTS

Date d'expédition
(jour/mois/année)

26.11.2001

Demande internationale No: PCT/FR00/02494

L'administration chargée de l'examen préliminaire international transmet ci-joint les documents suivants:

1. ☐ demande d'examen préliminaire international (règle 61.1.a)).
2. ☒ copie du rapport d'examen préliminaire international accompagné de ses annexes (règle 71.1).
3. ☐ autres documents (préciser):

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen
préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Digiusto, M

Tél. +49 89 2399-8162



THIS PAGE DELETED

PCT

REC'D 29 NOV 2001

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire BLOcp226/80P	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02494	Date du dépôt international (jour/mois/année) 08/09/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 10/09/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K39/07		
Déposant INSTITUT PASTEUR et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 10/04/2001	Date d'achèvement du présent rapport 26.11.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Renggli, J N° de téléphone +49 89 2399 7461 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02494

I. Bas du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-13 version initiale

Revendications, N°:

1-11 version initiale

Dessins, feuilles:

1/3-3/3 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02494

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n^{os} :
☐ des dessins, feuilles :
5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-8 Non : Revendications 9-11
Activité inventive	Oui : Revendications 1-7 Non : Revendications 8-11
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-11 Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (CONT.)

Section V:

1 Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: DATABASE WPI Section Ch, Week 200007 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-084616 XP002141827 & RU 2 115 433 C (MICROBIOLOGY RES INST), 20 juillet 1998 (1998-07-20)
- D2: WO 92 19720 A (PASTEUR INSTITUT) 12 novembre 1992 (1992-11-12) & FR 2 676 068 A 6 novembre 1992 (1992-11-06) cité dans la demande
- D3: EP-A-0 739 981 (UNIV BRUXELLES) 30 octobre 1996 (1996-10-30)
- D4: WELKOS S L FRIEDLANDER A M: 'Comparative safety and efficacy against Bacillus anthracis of protective antigen and live vaccines in mice' MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 5, no. 2, 1988, pages 127-140, XP000922808
- D5: TURNBULL P C B: 'ANTHRAX VACCINES: PAST, PRESENT AND FUTURE' VACCINE, vol. 9, no. 8, 1 août 1991 (1991-08-01), pages 533-539, XP000215550 cité dans la demande
- D6: STEPANOV A V ET AL: 'Development of novel vaccines against anthrax in man' JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, no. 1, 26 janvier 1996 (1996-01-26), pages 155-160, XP004036861
- D7: ABALAKIN V A ET AL.: 'Protective and other biological properties of Bacillus anthracis soluble antigen' JOURNAL OF HYGIENE, EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 35, no. 1, 1991, pages 83-95, XP000922839
- D8: ABALAKIN V A ET AL.: 'Vlianië protektivnogo antigena Bacillus anthracis na formirovanië immuniteta pod deistviem sibireiazvennykh jivykh vaktsin' ZHURNAL MIKROBIOLOGII, EPIDEMIOLOGII I IMMUNOLOGII, no. 5, 1990, pages 72-75, XP002141826

2 Application industrielle (Art. 33(4) PCT):

Le contenu des revendications 1-11 est susceptible d'application industrielle.

THIS PAGE BLANK (USFIC,

3 Nouveauté (Art. 33(2) PCT):

3.1 Revendications 1-7

Le document D1 (résumé Derwent) décrit un vaccin comprenant notamment des spores vivantes et l'antigène protecteur PA de B. anthracis.

Les revendications 1 et 3 de la présente demande se différencie donc de D1 en ce que des spores tuées sont présentes dans la composition immunogène ou vaccinale.

Les revendications 1-7 sont donc nouvelles par rapport au document de l'état de la technique le plus proche D1.

3.2 Revendications 8-11

La souche RPLC2 (voir figure 3 de la présente demande) semble nouvelle par rapport aux documents de l'art antérieur cité.

D2, le document le plus proche, ne semble pas décrire un double mutant ayant les mêmes caractéristiques techniques (voir D2, pages 28-29 et figure 1).

La revendication 8 est donc nouvelle.

D3 et D4 décrivent l'utilisation d'anticorps anti-B. anthracis permettant d'obtenir une immunité passive (voir D3, revendication 18 et D4, résumé).

La revendication 9 n'est donc pas nouvelle. Il est à noter que l'emploi de souches mutantes telles que décrites dans la revendication 9 n'exclut pas l'emploi des anticorps décrits dans D3 et D4.

D7 décrit des antigènes de B. anthracis 34F2 de 39-44 kD et 49-54 kD, obtenus à partir de surnageant de culture et démontrant une activité immunogénique sérologique (voir D7, page 88, dernier paragraphe).

D8 décrit des antigènes de 34 et 51 kD dérivés de l'antigène protecteur PA, ainsi qu'un antigène de 18 kD (voir D8, page 72, colonne de gauche, avant-dernier paragraphe et résumé français, page 75).

Les revendications 10 et 11 ne sont donc pas nouvelles par rapport à ces deux

THIS PAGE BLANK (USPTO)

documents. Une traduction complète du document D8 semble nécessaire afin de surmonter cette objection.

4 Activité inventive (Art. 33(3) PCT):

4.1 Revendications 1-7

Le problème que se propose de résoudre les revendications 1 et 3 peut être considéré comme étant la mise au point d'une composition immunogène alternative, respectivement vaccin alternatif au vaccin D1.

La solution proposée dans les revendications 1 et 3 de la présente demande, soit l'utilisation de spores tuées, est considérée comme inventive (article 33(3) PCT) pour les raisons suivantes:

Tout d'abord, aucun des document cités ne suggère de combiner des spores tués avec l'antigène protecteur PA. D'autre part, le document D5 indique que les vaccins atténués de *B. anthracis* sont moins efficaces (voir D5, page 534, colonne de gauche, 3e paragraphe).

Les compositions des revendications 1 et 3, permettant de façon surprenante d'obtenir des protections complètes (voir description de la demande pages 8, 9 et 11-13), peuvent donc être considérées comme inventives. Il s'ensuit que les revendications 2 et 4-7 sont également inventives.

4.2 Revendication 8

Il est noté que les gènes PA, LF et EF sont connus dans l'art antérieur (voir D2). Bien que nouvelle, la souche RPLC2 ne semble pas associée à un effet technique inattendu et ne semble pas permettre la résolution d'un problème technique qui ne pourrait être résolu par une autre souche déjà disponible dans l'art antérieur. En conséquence, la revendication 8, ayant pour objet une souche alternative de *B. anthracis*, n'est pas inventive. Il est de plus noté qu'elle a été présentée par le demandeur comme une alternative équivalente à au moins une souche connue (description de la présente demande, page 5, lignes 3-10).

THIS PAGE BLANK (US 10)

Section VII

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1, D3, D4, D7 et D8 et ne cite pas ces documents.

Section VIII

- 1 Les caractéristiques techniques entre parenthèses ne sont pas limitatives, voir revendications 1, 3, 4, 5 et 7 (Directives PCT, Gazette PCT-Section IV, III-4.11). Par conséquent, le terme PA n'est pas limitatif dans les revendications 1 et 3 et ceci introduit un doute quant au contenu des compositions des revendications 1-7 (Art. 6 PCT). D'autre part, le terme antigène protecteur, pris isolément, peut représenter divers antigènes, et n'est par ailleurs pas limité à un ou des antigènes de B. anthracis (Directives PCT, Gazette PCT-Section IV, III-4.2).
- 2 L'identification d'un antigène par son poids moléculaire seul n'est pas considéré comme suffisant (Art. 6 PCT). Toutes les étapes expérimentales ayant permis l'obtention et l'identification des exoantigènes auraient dû être incorporées dans la revendication 10 (Directives PCT, Gazette PCT-Section IV, III-4.2).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BL0cp226/80p	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02494	Date du dépôt international(jour/mois/année) 08/09/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 10/09/1999
Déposant INSTITUT PASTEUR		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/EP 00/02494

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K39/07 A61K39/40 C07K16/12 A61P31/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C12N C12R C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200007 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-084616 XP002141827 & RU 2 115 433 C (MICROBIOLOGY RES INST), 20 juillet 1998 (1998-07-20) abrégé ---	1-7
X	WO 92 19720 A (PASTEUR INSTITUT) 12 novembre 1992 (1992-11-12) revendications 1-5 & FR 2 676 068 A 6 novembre 1992 (1992-11-06) cité dans la demande --- -/--	8, 10, 11

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 739 981 A (UNIV BRUXELLES) 30 octobre 1996 (1996-10-30) revendication 18 ---	9
X	WELKOS S L FRIEDLANDER A M: "Comparative safety and efficacy against Bacillus anthracis of protective antigen and live vaccines in mice" MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 5, no. 2, 1988, pages 127-140; XP000922808 ---	9
A	le document en entier	1-11
X	TURNBULL P C B: "ANTHRAX VACCINES: PAST, PRESENT AND FUTURE" VACCINE, vol. 9, no. 8, 1 août 1991 (1991-08-01), pages 533-539, XP000215550 cité dans la demande tableau 3 ---	8
A	le document en entier	1-11
A	STEPANOV A V ET AL: "Development of novel vaccines against anthrax in man" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, no. 1, 26 janvier 1996 (1996-01-26), pages 155-160, XP004036861 ---	
A	ABALAKIN V A ET AL.: "Protective and other biological properties of Bacillus anthracis soluble antigen" JOURNAL OF HYGIENE, EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 35, no. 1, 1991, pages 83-91, XP000922839 le document en entier ---	10
A	ABALAKIN V A ET AL.: "Vlianië protektivnogo antigena Bacillus anthracis na formirovanië immuniteta pod deistviem sibireiazvennykh jivvykh vaktsin" ZHURNAL MIKROBIOLOGII, EPIDEMIOLOGII I IMMUNOLOGII, no. 5, 1990, pages 72-75, XP002141826 le document en entier -----	10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/02494

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
RU 2115433 C	20-07-1998	NONE	
WO 9219720 A	12-11-1992	FR 2676068 A EP 0537342 A US 5840312 A	06-11-1992 21-04-1993 24-11-1998
EP 0739981 A	30-10-1996	AU 5647896 A WO 9634103 A EP 0822985 A JP 11503918 T	18-11-1996 31-10-1996 11-02-1998 06-04-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 mars 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/19395 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:

A61K 39/07, 39/40, C07K 16/12, A61P 31/04

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement): **MOCK,**
Michèle [FR/FR]; 40 Boulevard de Reuilly, F-75012
PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/02494

(74) Mandataire: **CABINET ORES**; 6 avenue de Messine,
F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international:

8 septembre 2000 (08.09.2000)

(81) États désignés (national): CA, GB, US.

(25) Langue de dépôt:

français

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

(26) Langue de publication:

français

— Avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel bi-
ologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparé-
ment, et non avec la description.

(30) Données relatives à la priorité:

99/11384 10 septembre 1999 (10.09.1999) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): **IN-**
STITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du Docteur Roux,
F-75724 Cedex 15 PARIS (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: **ACELLULAR IMMUNOGENIC COMPOSITIONS AND ACELLULAR VACCINE COMPOSITIONS AGAINST
BACILLUS ANTHRACIS**

(54) Titre: **COMPOSITIONS ACELLULAIRES IMMUNOGENES ET COMPOSITIONS ACELLULAIRES VACCINALES
CONTRE BACILLUS ANTHRACIS**

(57) Abstract: The invention concerns an acellular immunogenic or vaccine composition for producing antibodies against *Bacillus anthracis* comprising a protective antigen (PA) and killed and optionally purified spores, obtained from mutating strains of *Bacillus anthracis* and their uses.

(57) Abrégé: Composition immunogène ou composition vaccinale acellulaire pour la production d'anticorps contre *B. anthracis* comprenant un antigène protecteur (PA) et des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues à partir de souches mutantes de *B. anthracis* et leurs applications.

WO 01/19395 A1

COMPOSITIONS ACELLULAIRES IMMUNOGENES ET COMPOSITIONS ACELLULAIRES VACCINALES CONTRE *BACILLUS ANTHRACIS*

La présente invention concerne des compositions acellulaires immunogènes ainsi que des compositions acellulaires vaccinales contre *Bacillus anthracis*, et leurs applications en médecine humaine et en médecine vétérinaire.

Bacillus anthracis (*B. anthracis*), agent responsable de l'anthrax ou charbon est une bactérie Gram-positive, aérobique et formant des spores.

Cet agent induit une infection soit par inoculation intradermique, soit par ingestion ou inhalation des spores (Klein F. *et al.*, (1966), *J. Infect. Dis.*, 116, 1213-138 ; Friedlander A.M. *et al.*, (1993), *J. Infect. Dis.*, 167, 1239-1242), dont la transformation en cellules végétatives, formes encapsulées et toxinogènes, permet à la bactérie de proliférer et de synthétiser ses facteurs de virulence.

Les Inventeurs ont récemment montré dans un modèle murin d'une infection pulmonaire par *B. anthracis*, que les macrophages alvéolaires sont le site primaire de la germination, qui est rapidement suivie par l'expression des gènes des toxines, confirmant que la rencontre de la spore avec l'hôte est cruciale pour la pathogénicité de *B. anthracis* (Guidi-Rontani E ; *et al.*, *Molecular Biology*, (1999), 31, 9-17).

Les principaux facteurs de virulence sont :

- la capsule anti-phagocytaire constituée d'acide poly- γ -D-glutamique (Avakyan A. A. *et al.* (1965), *J. of Bacteriology*, 90, 1082-1095) et
- trois facteurs protéiques agissant en combinaison par deux. La toxine oedématogène (PA-EF) induit un oedème après une injection sous-cutanée alors que la toxine létale (PA-LF) est responsable de la mort des animaux après injection intraveineuse (J. W. Ezzell *et al.*, (1984), *Infect. Immun.*, 45, 761-767. Le facteur présent dans les deux combinaisons est l'antigène protecteur (PA) qui intervient dans la fixation des toxines sur les cellules cibles. Les deux autres facteurs, le facteur oedématogène (EF) et le facteur létal (LF) sont responsables de la manifestation de l'effet toxique.

La production simultanée de la capsule et des toxines est indispensable pour la manifestation du pouvoir pathogène.

Les gènes codant pour les enzymes synthétisant la capsule sont portés par le plasmide pXO2 (Green B. D. *et al.*, (1985), *Infect. Immun.*, 49, 291-297 ; Uchida I. *et al.*, (1985), *J. Gen. Microbiol.*, 131, 363-367) et les trois gènes *pag*, *cya*, et *lef*, codant respectivement pour les facteurs PA, EF et LF sont portés par le

plasmide pXO1, qui a été décrit par Mikesell P. *et al.* (*Infect. Immun.*, (1983), 39, 371-376).

Alors que de nombreux travaux ont montré que PA est le principal antigène responsable de la protection dans le cadre d'une immunisation naturelle ou acquise par vaccination, les Inventeurs ont montré que LF est également un immuno-
5 gène puissant (Mock M. *Annales de l'Institut Pasteur* décembre 1990).

Afin de clarifier le rôle des composants des toxines dans la toxicité de *B. anthracis*, les Inventeurs ont construit divers mutants. Ainsi, ils ont caractérisé une souche dépourvue du plasmide pXO2 et dépourvue de PA par modification du
10 plasmide pXO1. Du fait de l'absence de PA, cette souche ne présente plus de caractère létal (Cataldi A. *et al.* (1990), *Molecular Microbiology*, 4, 1111-1117).

Pour rechercher les éléments susceptibles d'intervenir dans l'immunisation contre l'infection par *B. anthracis*, les Inventeurs ont construit des mutants, dépourvus d'au moins l'un des facteurs de toxicité responsable de la patho-
15 génicité, c'est-à-dire déficient en PA, en EF ou en LF, voire dépourvus du plasmide pXO1 et dépourvus en plus du plasmide pXO2. Bien que dépourvus de toxicité ou présentant une toxicité atténuée, les mutants simples, notamment RP9 (EF⁻) (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-1094 en date du 2 mai 1991) et RP10 (LF⁻) (Collection Nationale de
20 Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-1095 en date du 2 mai 1991), et le double mutant RP 42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999), se sont révélés aptes à produire des anticorps immunoprotecteurs contre une infection par une souche Sterne sauvage. Ces mutants sont décrits dans la
25 demande Internationale n° 92/19720, et dans les articles de Pezard C. *et al.*, (*Infection and Immunity*, (1991), 59, 3472-3477 et *J. General Microbiology*, (1993), 139, 2459-2463).

Actuellement, le vaccin vétérinaire commercialisé (Merial®) est un vaccin vivant composé d'une suspension de spores de la souche Sterne de *B.*
30 *anthracis*. Son efficacité protectrice chez l'animal varie selon les lots, sans que les causes de ces variations puissent être déterminées.

Cette efficacité aléatoire, des effets secondaires ainsi que le risque de dissémination potentielle de germes vivants dans l'environnement rendent son utilisation chez l'homme impossible.

35 En médecine humaine, deux vaccins contre la maladie du charbon, essentiellement développés en Angleterre et aux Etats-Unis sont utilisés. Il s'agit de vaccins acellulaires constitués principalement de l'antigène protecteur (PA), préparé à

partir de surnageants de culture de la souche toxigène Sterne de *B. anthracis* et d'un adjuvant pouvant être utilisé en médecine humaine, l'hydroxyde d'alumine.

Des études récentes sur ces deux vaccins ont montré que le vaccin anglais, contenant des traces de EF et de LF induisant une réponse anticorps en ELISA, était plus efficace sur le cobaye que le vaccin américain, apparemment
5 dépourvu de ces deux composants (Turnbull P.C. *et al.* (1991), *Vaccine*, 9, 533-539).

Toutefois ces deux vaccins présentent un certain nombre d'inconvénients :

- le protocole de vaccination est contraignant, car il nécessite six
10 injections en dix-huit mois, suivies d'un rappel par an,
- ils induisent des effets secondaires néfastes qui rendent leur utilisation limitée,
- la protection induite par ces vaccins acellulaires chez l'animal, envers un test d'épreuve avec une souche virulente, n'est jamais totale, contrairement
15 à celle obtenue avec le vaccin vivant.

Compte tenu de l'importance des infections causées par *B. anthracis*, de nombreux travaux sont actuellement consacrés à l'amélioration du vaccin afin qu'il ne présente pas les inconvénients exposés ci-dessus, tout en présentant la même protection que le vaccin vivant.

20 Dans ce cadre, les Inventeurs se sont donné pour but de pourvoir à un vaccin acellulaire fiable, efficace, dépourvu d'effets secondaires qui pallie les inconvénients des vaccins existants et dont les propriétés vaccinales soient faciles à contrôler.

La présente invention a en conséquence pour objet une composition
25 immunogène acellulaire, apte à induire une réponse immunitaire contre les infections à *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un antigène protecteur (PA),
- des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi
30 les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite
35 composition immunogène acellulaire est apte à produire des anticorps contre *B. anthracis*.

La présente invention a également pour objet une composition vaccinale acellulaire contre *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un antigène protecteur (PA),
- des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable et à au moins un adjuvant.

Au sens de la présente invention, le terme acellulaire signifie que la composition immunogène ou vaccinale ne contient plus de cellules viables (spores tuées).

Les adjuvants utilisés sont des adjuvants classiquement utilisés et seront notamment, soit la saponine dans le cas du vaccin vétérinaire, soit avantageusement choisis dans le groupe constitué par l'hydroxyde d'alumine et le squalène, dans le cas du vaccin humain.

Dans le cadre de la présente invention, les spores peuvent être tuées par tout moyen physique ou chimique conduisant à leur inactivation. A titre d'exemple on peut citer le traitement au formaldéhyde ou l'irradiation.

Au sens de la présente invention, on entend par mutation une délétion, une modification ou une addition au niveau du gène concerné, qui résulte soit en un gène dépourvu de sa capacité à produire la protéine correspondante, soit apte à produire une protéine inactive.

Selon un mode de réalisation particulier de l'Invention, les compositions immunogènes et les compositions vaccinales peuvent comprendre en outre au moins une exotoxine détoxifiée choisie notamment dans le groupe constitué par le facteur léthal (LF) et le facteur oedématogène (EF) détoxifiés, c'est-à-dire ayant perdu leurs propriétés toxiques.

Ces facteurs protéiques inactivés peuvent notamment être obtenus par expression des gènes mutés au niveau de la séquence codant pour le site actif desdits facteurs protéiques (*cya* ou *lef*).

Les compositions immunogènes et vaccinales selon l'Invention possèdent, de manière surprenante, un fort pouvoir protecteur, de l'ordre de 100 %, nettement supérieur à celui obtenu avec le PA seul ou les spores tuées seules, ce qui permet d'avoir une immunisation complète avec une seule injection

dans les conditions du vaccin vétérinaire et deux injections dans les conditions du vaccin à usage humain.

Selon un autre mode de réalisation avantageux des compositions immunogènes et vaccinales selon l'invention, les spores sont issues d'une souche de
5 *B. anthracis* choisie dans le groupe constitué par les souches suivantes : Sterne 7702 (M. Sterne *J. Vet. Sci. Anima. Indust.*, (1939), 13, 315-317), RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999) et RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du
10 28 juillet 1999).

Dans un autre mode de réalisation avantageux des compositions immunogènes et vaccinales selon l'invention, l'antigène protecteur est choisi dans le groupe constitué par les antigènes protecteurs purifiés, issus de n'importe quelle souche Sterne sauvage ou mutée de *B. anthracis*, et les antigènes protecteurs recombi-
15 nants, notamment celui produit par *B. subtilis*.

De manière avantageuse, l'antigène protecteur est issu de la souche RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

La présente invention a également pour objet la souche RPLC2
20 déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un anticorps dirigé contre les spores issues de souches, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi
25 les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2, pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive. En effet les antibiotiques sont le seul traitement actuel contre le charbon et doivent être administrés précocement, avant
30 l'apparition du choc toxique. En conséquence une sérothérapie visant à la fois les toxines et la germination des spores serait un bon complément.

Les anticorps peuvent être des anticorps polyclonaux obtenus par immunisation d'un animal approprié avec les spores issues de souches utilisées pour la préparation des compositions selon l'invention, dans des conditions habituelles de
35 préparation de tels anticorps.

Les anticorps peuvent être des anticorps monoclonaux obtenus de manière connue en soi, notamment par fusion des cellules spléniques de souris immu-

nisées avec un antigène consistant en des spores issues de souches utilisées pour la préparation des compositions selon l'invention.

La présente invention a également pour objet des préparations antigéniques purifiées, caractérisées en ce qu'elles sont issues de spores de *B. anthracis*, et comprennent par exemple un ou plusieurs des exoantigènes (protéines de spores et de l'exosporium) de poids moléculaires respectifs 15 kDa, 30 kDa, 55 kDa, et supérieur à 200 kDa, lesdits poids moléculaires étant déterminés par l'utilisation de la trousse *AMERSHAM® LMW Electrophoresis Calibration Kit*.

Conformément à l'invention, ces compositions antigéniques sont obtenues par des techniques classiques connues de l'homme du métier.

La présente invention a de plus pour objet les anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre lesdites compositions antigéniques.

Les compositions immunogènes et vaccinales selon l'invention peuvent être administrées, seules ou en combinaison avec d'autres vaccins, par injection ou par toute voie habituellement utilisée pour la vaccination.

Les dose à administrer seront déterminées en fonction de l'animal ou de la personne que l'on cherche à protéger.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description et des exemples illustrés par les figures dans lesquelles :

- la figure 1 représente l'analyse par immunoblot des protéines de la spore selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 5,

- la figure 2 représente l'analyse par immunoblot des protéines de l'exosporium (A) révélation par un anticorps polyclonal et un anticorps monoclonal (35B8) (B) analyse selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 5,

- la figure 3 représente les différentes souches de *B. anthracis* utilisées pour préparer la souche RPLC2. La souche RPLC2 produit les composants des toxines inactivés par mutations ponctuelles dans les sites actifs des protéines LF (LF686 ; H686→A) et EF (EF346/353 ; K346→Q et K353→Q). Dans cette figure, les nombres qui suivent Δ indiquent les nucléotides auxquels les délétions commencent et finissent ; Erm, Kan et Sps indiquent l'insertion de cassettes de résistance à l'érythromycine, à la kanamycine et à la spectinomycine ; Ø correspond à un organisme qui ne présente pas de résistance à ces antibiotiques.

EXEMPLE 1 : Matériel et méthode pour la préparation des compositions selon l'invention.

1.1. Construction de la souche RPLC2

La souche RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28

juillet 1999) est construite à partir des souches indiquées dans la figure 3, selon les principes opératoires décrits par Pezard C. *et al.* (1993) (référence citée).

1.2. Préparation du PA

La protéine PA est préparée à partir de la souche mutante de *B. anthracis* RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

Les surnageants de culture en milieu R (Ristroph J. D. *et al.* (1983), *Infection and Immunity*, 39, 483-486) sont filtrés puis concentrés sur un système Minitan® (membrane Millipore® PLGC OMP).

L'antigène PA est ensuite purifié par chromatographie ultra-rapide (FPLC) sur colonne monoQ® selon le protocole décrit par Pezard C. *et al.* (1993) (référence citée).

1.3. Préparation et inactivation des spores

Les spores sont préparées à partir de la souche Sterne 7702 selon le mode opératoire décrit par Guidi-Rontani E *et al.* (1999) (référence citée).

Les spores sont préparées sur un milieu solide NBY, puis lavées à l'eau distillée. Elles sont inactivées par traitement au formol, à une concentration finale de 4 %, pendant 3 heures à 37 °C.

Après lavage par centrifugation, les spores sont reprises dans le volume initial de sérum physiologique (concentration finale de 10⁹ spores/ml).

Cette suspension est utilisée pour réaliser l'immunisation.

Si nécessaire, notamment lorsque l'on veut préparer un vaccin à usage humain, les spores peuvent être purifiées avant le traitement au formol sur un gradient de Radioselectran® (Schering S.A.) de 50 % à 76 %.

1.4. Préparation des compositions vaccinales

Les compositions sont préparées soit à partir de spores tuées seules préparées selon le mode opératoire décrit en 1.3, soit à partir d'un mélange de PA (à une concentration telle qu'on injecte 10 µg par souris) et de spores tuées (10⁸ spores par souris), auxquels on ajoute comme adjuvant soit de l'hydroxyde d'alumine à une concentration finale de 0,3 %, soit de la saponine à une concentration finale de 0,05 %.

1.5. Protocole de traitement des souris

On utilise des souris Swiss femelles de six semaines fournies par la Société Iffa-Credo (BP0102 - 69592 L'ARBRESLE-Cedex).

Les animaux sont répartis en groupe de six et nourris *ad libitum*.

Les injections sont faites par voie sous-cutanée au niveau de l'aîne sous un volume de 200 µl.

1.6. Mesure des taux d'anticorps

Les taux d'anticorps sont mesurés par un test ELISA classique.

EXEMPLE 2 : Effet de deux immunisations dans les conditions du vaccin acellulaire humain (protocole n° 1)

5 2.1. Traitement des animaux

Le protocole d'injections pour chaque groupe est le suivant :

- deux injections de compositions vaccinales préparées comme indiqué au point 1.4. ou d'adjuvant (hydroxyde d'alumine) sont réalisées à 28 jours d'intervalles et

10 - une injection d'épreuve est réalisée au 43^{ième} jour avec la souche virulente 17JB de *B. anthracis* (souche de référence Pasteur n° 2) fournie par la Société Rhône-Mérieux.

Quatre groupes d'animaux sont immunisés selon ce protocole comme suit :

15 - le premier groupe reçoit l'hydroxyde d'alumine seule (groupe témoin),

- le second groupe reçoit une dose de PA de 10 µg par souris,

- le troisième groupe reçoit les spores seules à raison de 10⁸ spores par souris et

20 - le quatrième groupe reçoit le mélange PA + spores tuées de manière à avoir 10 µg de PA et 10⁸ spores par souris.

Tous les groupes reçoivent au 43^{ième} jour, comme précisé ci-dessus, une dose d'épreuve correspondant à 30 fois la DL50, soit 1,5 x 10⁴ spores par souris.

2.2. Résultats

25 Les taux de survie sont donnés dans le Tableau I ci-dessous.

TABLEAU I

Traitement	Nombre de morts au 43 ^{ième} jour	Pourcentage de survie au 43 ^{ième} jour
Adjuvant seul	6/6	0 %
PA seul	3/6	50 %
Spores tuées seules	2/6	33 %
PA + spores tuées	0/6	100 %

Ces résultats montrent clairement que seules les compositions vaccinales selon l'invention sont aptes à permettre une protection complète.

EXEMPLE 3 : Effet de deux immunisations dans les conditions du vaccin à usage humain (protocole n° 2)

5 3.1. Traitement des animaux

Le protocole d'injections pour chaque groupe est le suivant :

- deux injections de compositions vaccinales préparées comme indiqué au point 1.4. ou d'adjuvant (hydroxyde d'alumine) sont réalisées à 21 jours d'intervalles et

10 - une injection d'épreuve est réalisée au 32^{ième} jour avec la souche virulente 17JB de *B. anthracis* (souche de référence Pasteur n° 2) fournie par la Société Rhône-Mérieux.

Quatre groupes d'animaux sont immunisés selon ce protocole comme suit :

15 - le premier groupe reçoit l'hydroxyde d'alumine seule,
- le second groupe reçoit une dose de PA de 10 µg par souris,
- le troisième groupe reçoit les spores seules à raison de 10⁸ spores par souris et

20 - le quatrième groupe reçoit le mélange PA + spores tuées de manière à avoir 10 µg de PA et 10⁸ spores par souris.

Tous les groupes reçoivent, au 32^{ième} jour, comme précisé ci-dessus, une dose d'épreuve correspondant à 100 fois la DL50, soit 1,5 x 10⁴ spores par souris.

3.2. Résultats

3.2.1. *Taux de survie*

25 Les résultats sont donnés dans le Tableau II ci-dessous.

TABLEAU II

Traitement	Nombre de morts au 32 ^{ième} jour	Pourcentage de survie au 32 ^{ième} jour
Adjuvant seul	6/6	0 %
PA seul	1/6	83 %
Spores tuées seules	1/7	85 %
PA + spores tuées	0/6	100 %

Ces résultats montrent clairement que seules les compositions vaccinales selon l'invention sont aptes à permettre une protection complète.

3.2.2. *Taux d'anticorps*

Les taux d'anticorps dirigés contre les spores sont élevés, de l'ordre
5 de 10 000 à 15 000, et identiques dans les deux groupes qui les ont reçues, que ces spores soient seules ou associées à PA.

Ces résultats confirment l'effet de synergie des compositions selon l'invention, qui, avec un taux d'anticorps identique à celui obtenu par injection des spores tuées seules, permettent une protection complète.

10 **EXEMPLE 4 : Comparaison de l'efficacité des compositions vaccinales selon l'invention avec le vaccin vivant Sterne dans les conditions du vaccin à usage vétérinaire (une seule injection en utilisant la saponine comme adjuvant) : épreuve avec souche 17JB.**

4.1. Traitement des animaux

15 Le protocole d'injections pour chaque groupe est le suivant :

- une injection de compositions vaccinales préparées comme indiqué au point 1.4. ou de saponine est réalisée à J0 et
- une injection d'épreuve est réalisée au 32^{ième} jour avec la souche virulente 17JB de *B. anthracis* (souche de référence Pasteur n° 2) fournie par la
20 Société Rhône-Mérieux.

Cinq groupes d'animaux sont immunisés selon ce protocole comme suit :

- le premier groupe reçoit la saponine seule (groupe témoin),
- le second groupe reçoit une dose de PA de 10 µg par souris,
- 25 - le troisième groupe reçoit les spores seules à raison de 10⁸ spores par souris,
- le quatrième groupe reçoit le mélange PA + spores tuées de manière à avoir 10 µg de PA et 10⁸ spores par souris et
- le cinquième groupe reçoit le vaccin vivant Sterne préparé à
30 l'Institut Pasteur.

Tous les groupes reçoivent une dose d'épreuve correspondant à 100 fois la DL50, soit 10⁵ spores au 32^{ième} jour.

4.2. Résultats

Ils sont donnés dans le Tableau III ci-dessous.

TABLEAU III

Traitement	Nombre de morts au 32 ^{ème} jour	Pourcentage de survie au 32 ^{ème} jour
Adjuvant seul	6/6	0 %
PA seul	1/6	83 %
Spores vivantes	0/6	100 %
Spores tuées seules	4/6	33 %
PA + spores tuées	0/6	100 %

Ces résultats montrent clairement que les compositions vaccinales selon l'invention sont aussi efficaces que le vaccin vivant et pourraient par conséquent être avantageusement utilisées comme vaccin vétérinaire.

EXEMPLE 5 : Analyse par immunoblot des protéines de spores de *B. anthracis*

5.1. Matériel et méthode

5.1.1. Préparation des anticorps polyclonaux et monoclonaux.

Un sérum polyclonal de souris immunisées avec des spores tuées issues, par exemple, de la souche RPLC2 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999) est préparé selon des techniques classiques et connues de l'homme du métier.

L'anticorps monoclonal spécifique de la surface de la spore (35B8) est préparé selon la technique décrite par Kohler *et al.*, (1975), *Nature*, 296, 495-497.

5.1.2. Extraction des spores

Les protéines de la spore sont solubilisées par traitement des spores avec un tampon Tris-HCl à pH 9,8 contenant 8 M d'urée et 2 % de SDS ou avec un tampon Tris 10 mM à pH 9,5 contenant 10 mM d'EDTA et 1 % de SDS, selon la technique décrite par Garcia-Patrone, (1995), *Molecular and Cellular Biochem.*, 145, 29-37).

5.2. Résultats

Ils sont illustrés à la figure 1 et à la figure 2.

Le sérum polyclonal de souris reconnaît 3 espèces protéiques de poids moléculaire respectifs 15 kDa, 30 kDa, 55 kDa et une espèce protéique de poids moléculaire supérieur à 200 kDa. (Figure 1).

L'espèce la plus lourde est également reconnue par l'anticorps monoclonal 35B8 et semble appartenir à l'exosporium (Figure 2A).

En effet l'analyse par immunoblot des protéines de l'exosporium montre que les différents anticorps monoclonaux utilisés, dont 35B8, reconnaissent une espèce protéique de poids moléculaire supérieur à 200 kDa (Figure 2A).

Il ressort de ce qui précède que les compositions vaccinales selon l'invention sont aptes à permettre une protection complète aussi bien dans les conditions du vaccin humain que du vaccin vétérinaire.

EXEMPLE 6 : Comparaison de l'efficacité des compositions vaccinales selon l'invention administrées selon le protocole n° 1 de l'Exemple 2, avec l'antigène PA seul, chez la souris ou chez le cobaye : épreuve avec la souche 9602.

A. Souris Swiss

6.1. Traitement des animaux :

Le protocole d'injection pour chaque groupe est le suivant :

- deux injections des compositions vaccinales préparées comme indiqué au point 1.4 dans l'exemple 1 sont réalisées à 15 jours d'intervalle (J0 et J15),
et

- une injection d'épreuve est réalisée au 35^{ème} jour avec le souche virulente 9602 (M. Berthier et al., Lancet, 1996, 347, 9004:828) isolée à partir d'un cas mortel de charbon humain et dont la virulence est dix fois supérieure à celle de la souche 17JB utilisée dans les exemples précédents ; ladite souche est injectée en sous-cutanée.

4 groupes d'animaux tels que définis à l'exemple 2 sont immunisés selon ce protocole.

Tous les groupes reçoivent au 35^{ème} jour, comme précisé ci-dessus, une dose d'épreuve correspondant à 30 fois la DL50, soit $1,5 \times 10^4$ spores par souris.

6.2. Résultats

Les expériences ont été répétées 3 fois, avec des préparations différentes, sur des lots de 6 à 8 souris par point (pour raison de confinement P3).

Les taux de survie sont illustrés dans le Tableau IV ci-après.

TABEAU IV

Traitement	Pourcentage de survie au 35 ^{ème} jour et jusqu'au 43 ^{ème} jour
Adjuvant seul	0 %
PA seul	0 %
Spores tuées seules	0 %
PA + spores tuées	100 %

B. Cobayes.

Les expériences ont été réalisées 2 fois, sur des lots de 5 cobayes. Le protocole est similaire à celui utilisé chez la souris, à l'exception des points suivants :

- les doses de PA sont de 40 µg par animal,
- 5 - l'injection d'épreuve est réalisée par voie intramusculaire.

On obtient 100 % de survivants pour la combinaison selon l'invention, spores tuées + PA, contre 40 % chez les animaux recevant PA seul, composition du vaccin classique.

6.3. Taux d'anticorps.

- 10 Ces expériences (souris et cobayes) ont été accompagnées du suivi de la réponse en anticorps par ELISA sur des échantillons de sérum de souris et de cobayes. Les titres en anticorps envers PA sont élevés (> 5000) ; une réponse du même ordre est détectée envers des antigènes spécifiques de la spore.

- 15 **EXEMPLE 7 : Comparaison de l'efficacité des compositions vaccinales selon l'invention avec le vaccin vivant Sterne dans les conditions du vaccin à usage vétérinaire telles que décrites à l'Exemple 4 (épreuve avec souche 9602).**

- Le test a été réalisé sur souris Swiss (dans les conditions décrites à l'Exemple 4). L'injection d'épreuve est réalisée avec la souche 9602 (M. Berthier et al., précité) chez des souris ayant reçu une seule injection, soit de spores vivantes (RPLC2), soit de la combinaison selon l'invention, spores tuées + PA. L'efficacité de protection, de 83 %, est identique pour les deux lots.

Ces résultats montrent clairement qu'il est possible de protéger à 100 % des souris et des cobayes avec une combinaison vaccinale comportant des spores tuées et de l'antigène PA.

REVENDICATIONS

1. Composition immunogène acellulaire, apte à induire une réponse immunitaire contre les infections à *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un antigène protecteur (PA),
- 5 - des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2,
- 10 associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

2. Composition immunogène acellulaire selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est apte à produire des anticorps contre *B. anthracis*.

3. Composition vaccinale acellulaire contre *B. anthracis*, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 15 - un antigène protecteur (PA),
- des spores tuées et éventuellement purifiées, obtenues soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis*
- 20 dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et pXO2,
- associés au moins à un véhicule pharmaceutiquement acceptable et à au moins un adjuvant.

4. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, ou composition vaccinale selon la revendication 3, caractérisée en ce

25 qu'elle comprend en outre au moins une exotoxine détoxifiée choisie dans le groupe constitué par le facteur létal (LF) et le facteur oedématogène (EF) détoxifiés.

5. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, ou composition vaccinale selon la revendication 3, caractérisée en ce que les spores sont issues d'une souche de *B. anthracis* choisie dans le groupe constitué par les souches suivantes : Sterne 7702, RPLC2 (Collection Nationale de

30 Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999) et RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

6. Composition immunogène ou composition vaccinale selon l'une

35 quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'antigène protecteur est choisi dans le groupe constitué par les antigènes protecteurs purifiés, issus de

n'importe quelle souche Sterne sauvage ou mutée de *B. anthracis*, et les antigènes protecteurs recombinants.

7. Composition immunogène ou composition vaccinale selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'antigène protecteur est issu de la souche
5 RP42 (Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2271 en date du 28 juillet 1999).

8. Souche RPLC2 déposée auprès de la Collection Nationale de Cultures et de Microorganismes tenue par l'Institut Pasteur sous le numéro I-2270 en date du 28 juillet 1999.

10 9. Utilisation d'au moins un anticorps dirigé contre les spores issues de souches obtenues, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* portant une ou plusieurs mutations choisies parmi les mutations au niveau d'au moins un gène codant pour une protéine responsable d'un effet toxique chez *B. anthracis*, soit à partir de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues d'au moins un des plasmides pXO1 et
15 pXO2, pour la fabrication d'un médicament apte à induire une immunisation passive.

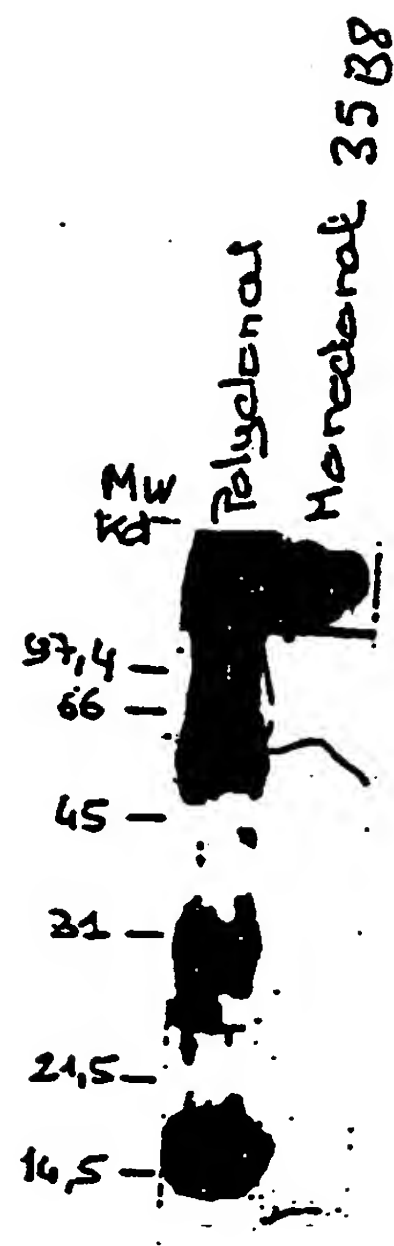
10. Préparations antigéniques purifiées, caractérisées en ce qu'elles sont issues de spores de *B. anthracis* et comprennent un ou plusieurs des exoantigènes de poids moléculaires respectifs 15 kDa, 30 kDa, 55 kDa, et supérieur à 200 kDa.

11. Anticorps dirigés contre les préparations antigéniques selon la
20 revendication 10.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

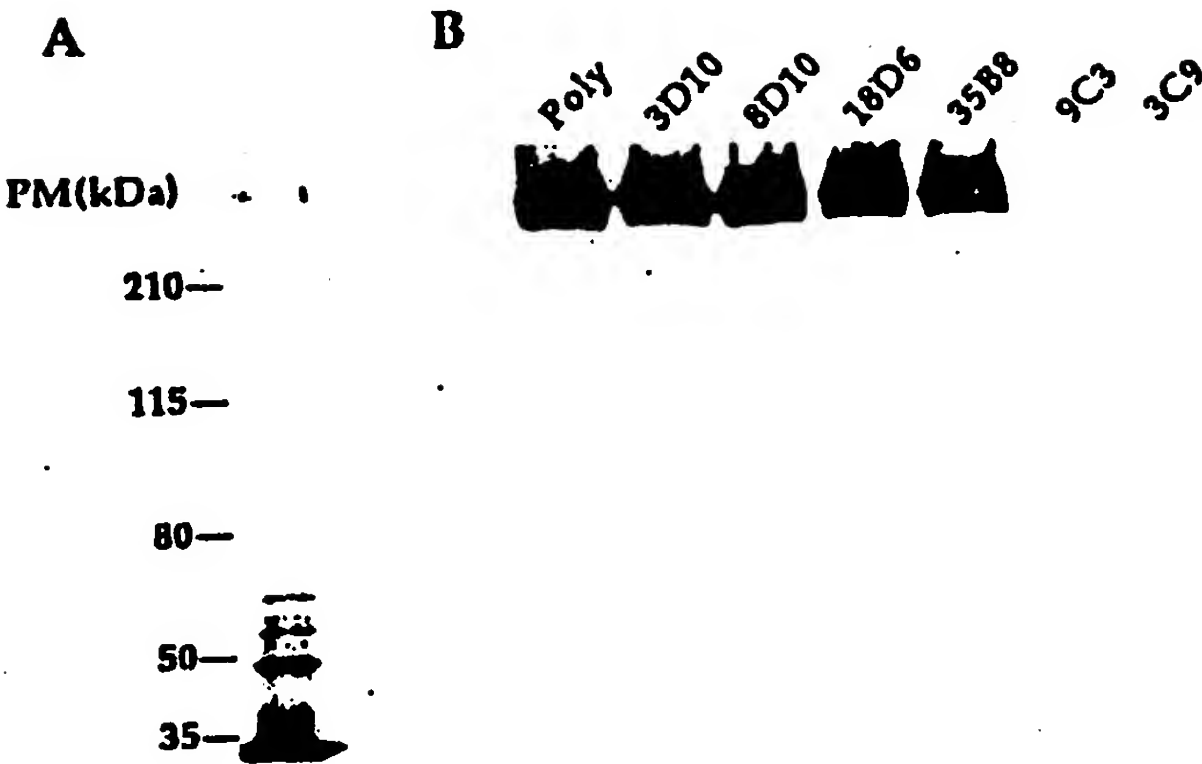
1/3

FIGURE 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIGURE 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

FIGURE 3

Souche	Génotype	Résistance à un antibiotique	Facteurs produits			Souche parentale
			PA	LF	EF	
7702	pXOI	Ø				Souche Sterne (Collection Pasteur)
RPA	pXOI- <i>mgA</i> (1805-2871)	Sp	—	LF	EF	7702
RPA200	pXOI- <i>mgA</i> (1805-4105)	Erm	—	LF	EF	7702
RPL	pXOI- <i>lefA</i> (2105-2970)	Sp	PA	—	EF	7702
RPL200	pXOI- <i>lefA</i> (405-2911)	Erm	PA	—	EF	7702
RPE	pXOI- <i>cynA</i> (400-2311)	Sp	PA	LF	—	7702
RPE346	pXOI- <i>cynA</i> 346/353	Ø	PA	LF	EF346/353	RPE
RPL686	pXOI- <i>lef</i> 686	Ø	PA	LF686	EF	RPL
RPL686Δ <i>cyn</i>	pXOI- <i>cynA</i> (1114-2420)	Kan	PA	LF686		RPL686
RPLC2	pXOI- <i>lef</i> 686- <i>cyn</i> 346/353	Ø	PA	LF686	EF346/353	RPL686Δ <i>cyn</i>
RPA163	pXOI- <i>mgA</i> (2374-2394)	Ø	PA163	LF	EF	RPA
RPA313	pXOI- <i>mgA</i> (2826-2933)	Ø	PA313	LF	EF	RPA
RPA705	pXOI- <i>mgA</i> (4005-4053)	Ø	PA705	LF	EF	RPA200
RPA608	pXOI- <i>mgA</i> 608	Ø	PA608	LF	EF	RPA200

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No.
PCT/FR 00/02494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/07 A61K39/40 C07K16/12 A61P31/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C12N C12R C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200007 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-084616 XP002141827 & RU 2 115 433 C (MICROBIOLOGY RES INST), 20 July 1998 (1998-07-20) abstract	1-7
X	WO 92 19720 A (PASTEUR INSTITUT) 12 November 1992 (1992-11-12) claims 1-5 & FR 2 676 068 A 6 November 1992 (1992-11-06) cited in the application	8,10,11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 December 2000

Date of mailing of the international search report

13/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Teyssier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/02494

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	EP 0 739 981 A (UNIV BRUXELLES) 30 October 1996 (1996-10-30) claim 18 ---	9
X	WELKOS S L FRIEDLANDER A M: "Comparative safety and efficacy against Bacillus anthracis of protective antigen and live vaccines in mice" MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 5, no. 2, 1988, pages 127-140, XP000922808 ---	9
A	the whole document	1-11
X	TURNBULL P C B: "ANTHRAX VACCINES: PAST, PRESENT AND FUTURE" VACCINE, vol. 9, no. 8, 1 August 1991 (1991-08-01), pages 533-539, XP000215550 cited in the application table 3 ---	8
A	the whole document	1-11
A	STEPANOV A V ET AL: "Development of novel vaccines against anthrax in man" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, no. 1, 26 January 1996 (1996-01-26), pages 155-160, XP004036861 ---	
A	ABALAKIN V A ET AL.: "Protective and other biological properties of Bacillus anthracis soluble antigen" JOURNAL OF HYGIENE, EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 35, no. 1, 1991, pages 83-91, XP000922839 the whole document ---	10
A	ABALAKIN V A ET AL.: "Vlianië protektivnogo antigena Bacillus anthracis na formirovanië immuniteta pod deistviem sibireiazvennykh jivvykh vaktsin" ZHURNAL MIKROBIOLOGII, EPIDEMIOLOGII I IMMUNOLOGII, no. 5, 1990, pages 72-75, XP002141826 the whole document -----	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR 00/02494

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
RU 2115433 C	20-07-1998	NONE	
WO 9219720 A	12-11-1992	FR 2676068 A EP 0537342 A US 5840312 A	06-11-1992 21-04-1993 24-11-1998
EP 0739981 A	30-10-1996	AU 5647896 A WO 9634103 A EP 0822985 A JP 11503918 T	18-11-1996 31-10-1996 11-02-1998 06-04-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Internationale No
PCT/FR 00/02494

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K39/07 A61K39/40 C07K16/12 A61P31/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K C12N C12R C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 200007 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-084616 XP002141827 & RU 2 115 433 C (MICROBIOLOGY RES INST), 20 juillet 1998 (1998-07-20) abrégé</p>	1-7
X	<p>WO 92 19720 A (PASTEUR INSTITUT) 12 novembre 1992 (1992-11-12) revendications 1-5 & FR 2 676 068 A 6 novembre 1992 (1992-11-06) cité dans la demande</p>	8,10,11

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

6 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Teyssier, B

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No

PCT/FR 00/02494

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 739 981 A (UNIV BRUXELLES) 30 octobre 1996 (1996-10-30) revendication 18 ---	9
X	WELKOS S L FRIEDLANDER A M: "Comparative safety and efficacy against Bacillus anthracis of protective antigen and live vaccines in mice" MICROBIAL PATHOGENESIS, vol. 5, no. 2, 1988, pages 127-140, XP000922808 ---	9
A	le document en entier ---	1-11
X	TURNBULL P C B: "ANTHRAX VACCINES: PAST, PRESENT AND FUTURE" VACCINE, vol. 9, no. 8, 1 août 1991 (1991-08-01), pages 533-539, XP000215550 cité dans la demande tableau 3 ---	8
A	le document en entier ---	1-11
A	STEPANOV A V ET AL: "Development of novel vaccines against anthrax in man" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, no. 1, 26 janvier 1996 (1996-01-26), pages 155-160, XP004036861 ---	
A	ABALAKIN V A ET AL.: "Protective and other biological properties of Bacillus anthracis soluble antigen" JOURNAL OF HYGIENE, EPIDEMIOLOGY, MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, vol. 35, no. 1, 1991, pages 83-91, XP000922839 le document en entier ---	10
A	ABALAKIN V A ET AL.: "Vlianië protektivnogo antigena Bacillus anthracis na formirovanië immuniteta pod deistviem sibireiazvennykh jivvykh vaktsin" ZHURNAL MIKROBIOLOGII, EPIDEMIOLOGII I IMMUNOLOGII, no. 5, 1990, pages 72-75, XP002141826 le document en entier -----	10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres des familles de brevets

Derr. internationale No

PCT/FR 00/02494

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
RU 2115433 C	20-07-1998	AUCUN	
WO 9219720 A	12-11-1992	FR 2676068 A EP 0537342 A US 5840312 A	06-11-1992 21-04-1993 24-11-1998
EP 0739981 A	30-10-1996	AU 5647896 A WO 9634103 A EP 0822985 A JP 11503918 T	18-11-1996 31-10-1996 11-02-1998 06-04-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)